

一种改良的分枝菌酸提取及其非放射性 TLC 检测方法

徐思悦¹, 狄玉昌¹, 迟明哲¹, 胡酉炜¹, 张潇¹, 张雪莲^{1,2*}

1 复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

2 复旦大学 上海工业菌株工程技术研究中心, 上海 200433

徐思悦, 狄玉昌, 迟明哲, 胡酉炜, 张潇, 张雪莲. 一种改良的分枝菌酸提取及其非放射性 TLC 检测方法[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3827-3837.

XU Siyue, DI Yuchang, CHI Mingzhe, HU Youwei, ZHANG Xiao, ZHANG Xuelian. An improved extraction and nonradioactive thin-layer chromatography detection method of mycolic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3827-3837.

摘要: 分枝菌酸(mycolic acid, MA)是存在于分枝杆菌细胞壁中的独特长链脂肪酸, 与分枝杆菌(mycobacterium)抵御不利环境、耐受抗生素和逃避宿主免疫密切相关, 是较热门的抗结核药物筛选的靶点。MA 的检测方法主要有放射性薄层层析(thin-layer chromatography, TLC)和液相色谱-质谱(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS), 受放射性元素使用资质和标准品等的限制, MA 分析是分枝杆菌相关研究的一个难点。本研究采用一种普通薄层层析技术, 并对使用四丁基氢氧化铵溶液水解酯化的分枝菌酸, 将其甲酯化后再用无水乙醚萃取分枝菌酸甲酯的操作步骤进行改良, 使分枝杆菌的 MA 提取及分析可在常规生物实验室中开展。研究通过比较不同分枝杆菌及不同生长时期的 MA 成分与亚型特征、检测靶向分枝菌酸合成通路的抗结核药物对细菌 MA 合成影响以及分枝杆菌突变株对结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) H37Ra 分枝菌酸合成影响等基础和应用的 3 个方面, 进一步验证该方法在分枝杆菌 MA 分析中的实用性。结果表明该方法在不使用放射性元素和缺少标准品情况下可简便快速地分析 MA 及亚型特征, 可广泛用于新型抗分枝杆菌药物筛选靶向分枝菌酸合成通路机制及基础研究中 MA 相关的分析和应用。

关键词: 分枝杆菌; 分枝菌酸; 薄层层析

资助项目: 国家自然科学基金(81971898, 82273974)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81971898, 82273974).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-31246587, E-mail: xuelianzhang@fudan.edu.cn

Received: 2022-11-19; Accepted: 2023-02-07; Published online: 2023-02-10

An improved extraction and nonradioactive thin-layer chromatography detection method of mycolic acid

XU Siyue¹, DI Yuchang¹, CHI Mingzhe¹, HU Youwei¹, ZHANG Xiao¹, ZHANG Xuelian^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Industrial Microorganisms, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Mycolic acids (MAs), i.e. 2-alkyl, 3-hydroxy long-chain fatty acids, are the hallmark of the cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* and are related with antibiotic resistance and host immune escape. Nowadays, they've become hot target of new anti-tuberculosis drugs. There are two main methods to detect MAs, ¹⁴C metabolic labeling thin-layer chromatography (TLC) and liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS). However, the user qualification of ¹⁴C or the lack of standards for LC-MS hampered the easy use of this method. TLC is a common way to analyze chemical substance and can be used to analyze MAs. In this study, we used tetrabutylammonium hydroxide and methyl iodide to hydrolyze and formylate MAs from mycobacterium cell wall. Subsequently, we used diethyl ether to extract methyl mycolate. By this method, we can easily extract and analyze MA in regular biological labs. The results demonstrated that this method could be used to compare MAs of different mycobacterium in different growth phases, MAs of mycobacteria treated by anti-tuberculosis drugs or MAs of mycobacterium mutants. Therefore, we can use this method as an initial validation for the changes of MAs in researches such as new drug screening without using radioisotope or when the standards are not available.

Keywords: *Mycobacteria*; mycolic acids; thin layer chromatography

结核病(tuberculosis, TB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)导致的传染性疾病,全球约有 1/4 人口潜伏感染结核分枝杆菌。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报道,2019年新冠病毒的暴发逆转了多年来全世界在治疗和预防结核病方面取得的进展,因此全球结核病的防控形势依然严峻^[1]。分枝杆菌细胞壁富含独特的分枝菌酸,分枝菌酸是一种含有极长碳链(C60–C90)的 α -烷基- β -羟基-脂肪酸,根据主链上携带的不同官能团,可分为环丙烷-分枝菌酸(α -MA)、甲基-分枝菌酸(m-MA)、酮基-分枝菌酸(k-MA)和环氧基-分枝菌酸(ϵ -MA)等^[2]。分枝菌酸合成包括I型脂肪酸合成通路(FAS-I)和II型脂肪酸合成

通路(FAS-II), FAS-I介导普通碳链延长得到 C22–C26 的烷基部分, FAS-II则使碳链继续延长达到 C42–C62, 随后对碳链引入甲氧基、酮基等官能团,最后经过缩合与还原反应后生成成熟的不同类型的 MA^[2-4]。分枝菌酸是导致 Mtb 细胞壁致密且渗透性低、使 Mtb 能抵御不利环境、耐受抗生素和逃避宿主免疫的关键。因此破坏 MA 的生物合成是一种有效杀死分枝杆菌的方法,故 MA 合成通路成为较热门的抗结核靶点。如硫脲药物 isoxyl (ISO)抑制脂肪酸去饱和酶 DesA3 和 FAS-II中的脱氢酶 HadABC^[5]; 硫脲药物 thiacetazone (TAC)抑制 FAS-II中的脱氢酶 HadABC 和甲基转移酶 MmaA4^[5]; 异烟肼(isoniazid, INH)和 ethionamide (ETH)抑制 FAS-II

中的还原酶 InhA^[6]；另外新药德拉马尼(delamanid)^[7]和普托马尼(pretomanid)^[8]的作用机制之一可能是影响 Mtb 分枝菌酸合成。

鉴于 MA 在 Mtb 生理功能及抗结核药物研发中的重要性，因此测定菌株 MA 的方法成为开展 Mtb 基础研究和药物研发的一项重要技术。然而目前 MA 检测方法是采用放射性薄层层析或色谱-质谱技术，而由于放射性物质使用资质和生物安全要求，以及色谱-质谱标准品和数据库的限制，导致分析 MA 成为研究分枝菌酸通路的一个难点。基于此，本文建立一种可在普通生物实验室中操作的提取分枝菌酸和用薄层层析检测的改良方法，并通过比较不同分枝杆菌不同生长时期的 MA 成分与比例、检测靶向分枝菌酸合成通路的抗结核药物处理对细菌 MA 影响及分枝杆菌突变株对 Mtb 分枝菌酸合成影响等 3 个方面对该方法进行验证，确定该改良方法在分枝杆菌分型、抗 Mtb 新药研发及基础研究等多场景研究中用于检测分枝菌酸合成变化的可靠性。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

结核分枝杆菌 H37Ra (Mtb)、无毒牛型结核杆菌 (*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Danish, BCG)、海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*, Mm)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, Msm) 和脓肿分枝杆菌 (*Mycobacterium abscessus*, Mab) 为本实验室保存菌株。

1.1.2 试剂及培养基

四丁基氢氧化铵溶液(25% in H₂O)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；二氯甲烷、无水乙醚、三氯甲烷、甲醇、正己烷、乙酸乙

酯、丙酮、甲苯购自国药集团有限公司；碘甲烷购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司；层析板购自烟台华阳新材料科技有限公司；毛细管购自德国赫斯曼公司；磷钼酸购自生工生物工程(上海)股份有限公司；Middlebrook 7H9 购自美国碧迪医疗器械有限公司；OADC [5% 牛血清白蛋白购自 MP 生物医疗公司；0.03% catalase 购自 Sigma-Aldrich 公司；2% 葡萄糖、0.85% 氯化钠和 0.01% 油酸购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

细菌在 7H9 (添加 10% OADC) 的液体培养基中培养。接种 2×10^6 个细菌至 50 mL 7H9 培养基内，Mtb、BCG 37 °C 静置培养，Mm 30 °C、100 r/min 振荡培养，Mab、Msm 37 °C、100 r/min 振荡培养。

1.2.2 细菌分枝菌酸提取

取 50 mL 培养至对数期(OD_{600} 为 0.6–1.0) 或稳定期(Mtb、BCG 静置培养超过 30 d, Mm、Mab 振荡培养超过 14 d, Msm 振荡培养超过 2 d) 的分枝杆菌，4 000 r/min 离心 10 min 后弃上清，加入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)重悬并转移至 2 mL EP 管内，7 000 r/min 离心 10 min 后弃上清，–80 °C 放过夜。每管加入 720 μ L 水和 1 080 μ L 四丁基氢氧化铵溶液(25% in H₂O)，重悬菌体，用针头在 EP 管盖上扎洞，放入 100 °C 的恒温金属浴中反应 7 h。冷却后将液体重悬转移至 15 mL 离心管，加入 2 mL 单蒸水、3 mL 二氯甲烷和 300 μ L 碘甲烷，放在摇床上最低转速摇晃混匀 1 h，3 000 r/min 离心 5 min 后弃水相。加入 3 mL 单蒸水，摇晃混匀，3 000 r/min 离心 5 min 后弃水相，重复 2 次。将剩余 3 mL 有机相分装于 2 个 2 mL EP 管中，放于通风橱内过夜晾干。于通风橱内每

管加入 1.5 mL 无水乙醚, 打开超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号 JY92-IIN), 选用 2 号变幅杆, 设置功率为 30%、超声时间为 1 min, 超声结束后加入 500 μ L 无水乙醚。3 000 r/min 离心 20 min, 期间称取 2 mL 空 EP 管若干并记录管重于管壁, 待离心结束后将上清液转移至该空 EP 管内, 然后于通风橱中晾干溶剂无水乙醚, 得到黄色油脂状物质。称重 EP 管, 并减去标记在管壁上的空管质量, 即为所得提取物的总质量。所有样品分别用溶剂(三氯甲烷:甲醇=2:1)统一溶至 33 μ g/ μ L 的浓度, 点样 6 μ L, 约为 200 μ g。

1.2.3 单向薄层层析分离分枝菌酸

(吸附)薄层层析, 或称(吸附)薄层色谱, 是一种常用以分离、鉴定或定量混合物成分的技术。其原理是各成分对同一吸附剂(本文为硅胶)吸附能力不同, 因而在溶剂(流动相)流过吸附剂(固定相)的过程中, 吸附、解吸附、再吸附的效率不同, 从而分离各成分。

将硅胶层析预制板裁成合适大小, 并在上下两边距离 1 cm 处用铅笔轻轻划线, 下侧线为点样起始线, 上侧线为溶剂展开的终点线。用 2 μ L 毛细管吸取共 200 μ g 样品点于层析板上, 每个样之间间隔 0.5–1 cm, 距离左右两侧 1 cm 以上, 全部点完后晾干 5 min。配制展开剂(正己烷:乙酸乙酯=19:1), 加入层析缸中预饱和 20 min。将层析板放入缸中, 展开至溶剂前沿到达终点线则取板晾干, 再放入缸中展开, 共展开 3 次。晾干, 均匀喷洒 5%磷钼酸-乙醇溶液, 晾干后用 400 $^{\circ}$ C 热风枪烤板显影。

1.2.4 二向薄层层析分离分枝菌酸

将层析预制板裁成 6 cm \times 6 cm 的方板, 并在四边距离 1 cm 处用铅笔轻轻划线, 下侧线为纵向点样起始线, 上侧线为纵向溶剂展开的终点线, 左侧线为横向起始线, 右侧线为横向溶

剂展开的终点线。下侧线与左侧线的交点为点样处, 用 2 μ L 毛细管吸取共 200 μ g 样品点于板上, 晾干 5 min。配置纵向展开剂(正己烷:丙酮=19:1), 预饱和 20 min。先纵向由下至上跑, 共展开 3 次, 晾干。配制横向展开剂(甲苯:丙酮=19:1), 预饱和 20 min, 然后横向从左往右展开 1 次。晾干, 显影操作同 1.2.3。

2 结果与分析

2.1 不同分枝杆菌菌株在不同生长时期的分枝菌酸的比较

为验证该方法的可行性, 本研究分别培养 Msm、Mm、Mtb H37Ra、BCG Danish 和 Mab 至对数期和稳定期后, 分别用四丁基氢氧化铵溶液水解酯化的分枝菌酸, 并将其甲酯化, 再通过无水乙醚萃取分枝菌酸甲酯, 通风橱内晾干后, 利用单向薄层层析法比较相同提取物质量下的不同生长时期各种分枝杆菌菌株的分枝菌酸的亚型及含量。结果如图 1 所示, 不同分枝杆菌的分枝菌酸亚型及含量存在较大差异, 其中 Msm 含 α 、 α' 和 ϵ 型, Mm 和 Mtb 含 α 、m 和 k 型, BCG Danish 只含 α 和 k 型, Mab 只含 α 和 α' 型。此外, 即使是含相同亚型的 Mm 和 Mtb, 其亚型间的比例也不相同, Mm 3 种亚型的比例比 Mtb 更均匀, 而 Mtb 的 k 型分枝菌酸较 α 和 m 型明显少; BCG 则是 k 型分枝菌酸多于 α 型。另外结果还表明处于稳定期的分枝杆菌的分枝菌酸各亚型的含量显著大于其处于对数期的含量。

同时利用二向薄层层析展开技术比较不同菌株的分枝菌酸的亚型及含量。图 2 显示各菌株分枝菌酸的亚型及含量结果与单向薄层层析结果一致, 同样稳定期分枝杆菌的分枝菌酸各亚型的量显著大于对数期分枝菌酸各亚型含量。

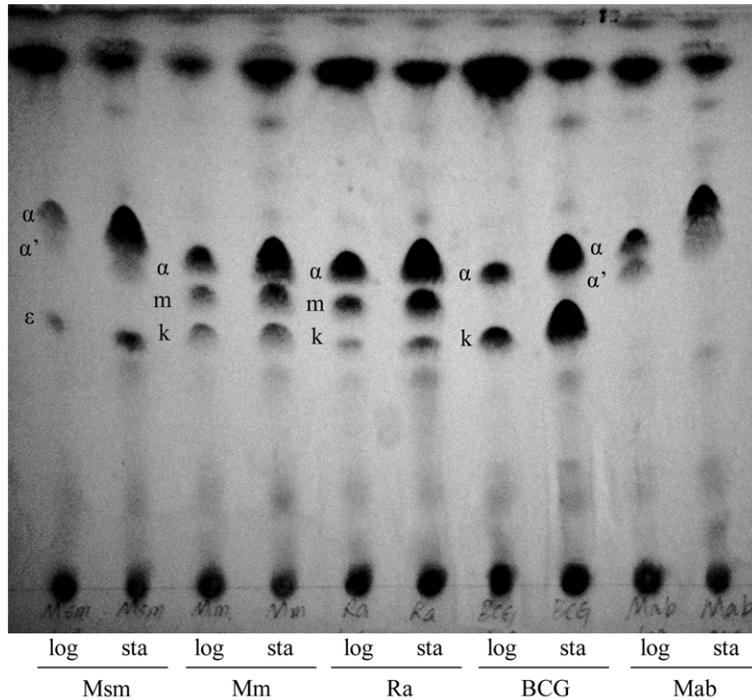


图 1 不同分枝杆菌菌株在不同生长时期的分枝菌酸的单向 TLC 比较

Figure 1 One dimensional TLC analysis of methyl esters of mycolic acids (MAME) isolated from Msm, Mm, Mtb H37Ra, BCG, Mab at log phase or stationary phase. Different forms of methyl esters were separated in n-hexane/ethyl acetate (95:5; 3 runs). α : α -mycolate; α' : α' -mycolate; ϵ : Epoxy-mycolate; m: Methoxy-mycolate; k: Keto-mycolate; log: Log phase; sta: Stationary phase.

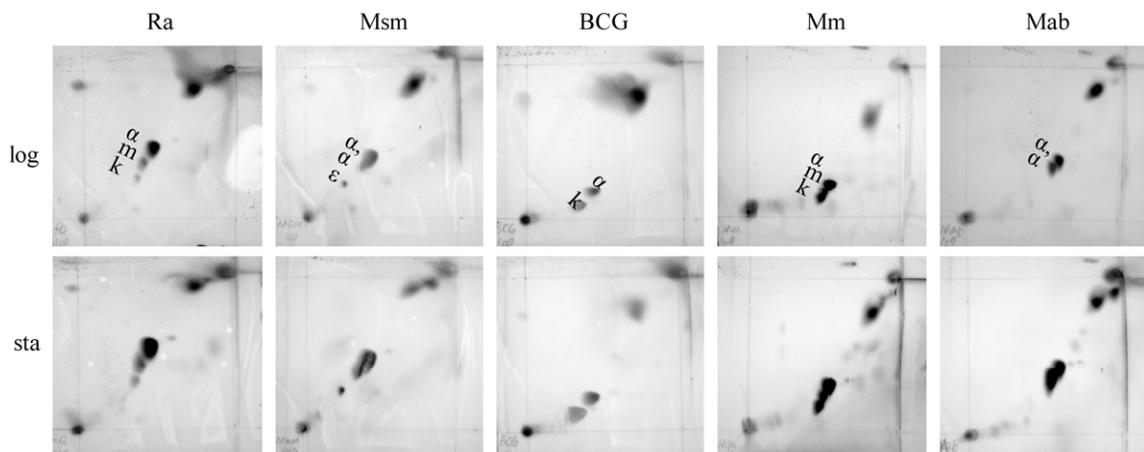


图 2 不同分枝杆菌菌株在不同生长时期的分枝菌酸的二向 TLC 比较

Figure 2 Two dimensional TLC analysis of methyl esters of mycolic acids (MAME) isolated from Msm, Mm, Mtb H37Ra, BCG, Mab at log phase or stationary phase. Different forms of methyl esters were separated in n-hexane/acetone (19:1; 3 runs) in the first direction and in toluene/acetone (19:1; 1 run) in the second direction. α : α -mycolate; α' : α' -mycolate; ϵ : Epoxy-mycolate; m: Methoxy-mycolate; k: Keto-mycolate; log: Log phase; sta: Stationary phase.

有研究表明, 相比于 Mtb 含 α 、m 和 k 型, BCG Danish 只含 α 和 k 型的主要原因是基因组中缺失分枝菌酸甲基转移酶基因 *mmaA3*^[9]。为进一步验证提取产物与分析结果的正确性, 利用构建过表达甲基转移酶 MmaA3 的重组 BCG Danish 菌株(BCG::*mmaA3*), 分析甲基转移酶 MmaA3 是否影响 BCG 分枝菌酸的合成。分别培养 BCG::*mmaA3* 及野生型 BCG 菌株至对数期, 提取分枝菌酸并比较相同提取物质量下的分枝菌酸含量。结果如图 3 所示, 野生型菌株和过表达菌株之间的分枝菌酸亚型有明显差异, 野生型 BCG 只有 α 和 k 型, 而过表达菌株甲基转移酶 MmaA3 菌株则含 α 、m 和 k 型 3 种分枝菌酸,

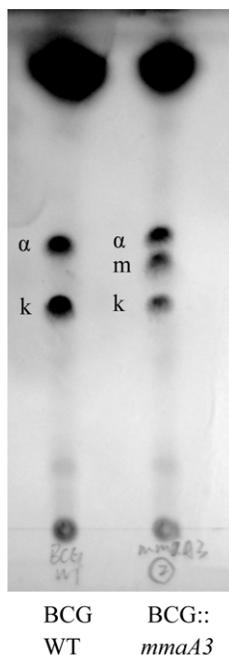


图 3 甲基转移酶 *mmaA3* 过表达株对 BCG Danish 分枝菌酸影响的单向 TLC 分析

Figure 3 One dimensional TLC analysis of methyl esters of mycolic acids (MAME) isolated from BCG Danish::*mmaA3* and BCG Danish wild type. Different forms of methyl esters were separated in n-hexane/ethyl acetate (95:5; 3 runs). α : α -mycolate; m: Methoxy-mycolate; k: Keto-mycolate; WT: Wild type.

再次说明该方法的提取产物是分枝菌酸, 确证该方法的可靠性。

为确定分枝菌酸在稳定期是否有变化, 将 Msm 分别培养至对数期和稳定期, 并提取对数期及处于 2、3、4、5、6 d 不同稳定期分枝杆菌的分枝菌酸后, 利用单向和二向薄层层析法展开相同质量提取物, 比较不同时间点下耻垢分枝杆菌的分枝杆菌亚型及含量。结果如图 4A 和 4B 所示, 分枝杆菌除稳定期菌分枝菌酸量多于对数期菌外, 进入稳定期后, Msm 的分枝菌酸各亚型含量不随时间增长而改变, 提示分枝菌酸主要在分枝杆菌活跃生长过程中合成^[2-3], 且分枝菌酸的稳定性较好, 分枝菌酸含量不随进入稳定期后的时间长短而发生降解和变化。

2.2 靶向分枝菌酸合成通路的抗结核药物处理对细菌 MA 影响

为验证该方法在新药研发中的应用, 选取已知靶向分枝菌酸合成的药物(TAC 和 INH), 并在培养 Mtb 时加入一定浓度的抗结核药物于培养基中 37 °C 孵育 24 h, 提取分枝菌酸并分析比较加药及不加药菌株的相同提取物质量下的分枝菌酸含量差异。结果如图 5 所示, 相比于图 5A 未加药仅含 DMSO 溶剂的对照菌株, TAC 处理后的结核分枝杆菌, 其分枝菌酸各亚型含量明显少于用同体积 DMSO 处理后的对照组(图 5B), INH 处理后的结核分枝杆菌分枝菌酸各亚型含量也少于对照组(图 5C), 说明此方法可用于可能靶向分枝菌酸合成通路药物或活性化合物的作用机制研究。

2.3 在基因突变株中开展分枝菌酸合成调控机制的研究应用

为评价该方法在结核相关基础研究中的应用, 本研究利用笔者课题组前期构建的可影响 Mtb 菌体蛋白乙酰化修饰的去乙酰化酶编码基

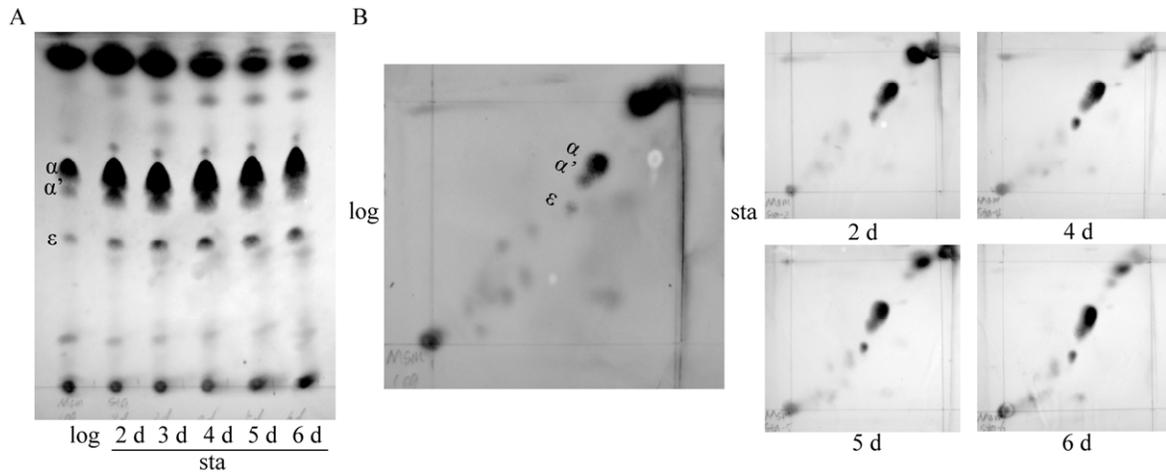


图 4 不同生长时期的耻垢分枝杆菌菌株的分枝菌酸的 TLC 比较

Figure 4 One dimensional (A) and two dimensional (B) TLC analysis of methyl esters of mycolic acids (MAME) isolated from Msm harvested on different days. Different forms of methyl esters were separated in n-hexane/ethyl acetate (95:5; 3 runs) (A) or in n-hexane/acetone (19:1; 3 runs) in the first direction and in toluene/acetone (19:1; 1 run) in the second direction (B). α : α -mycolate; α' : α' -mycolate; ϵ : Epoxy-mycolate; d: Days; log: Log phase; sta: Stationary phase.

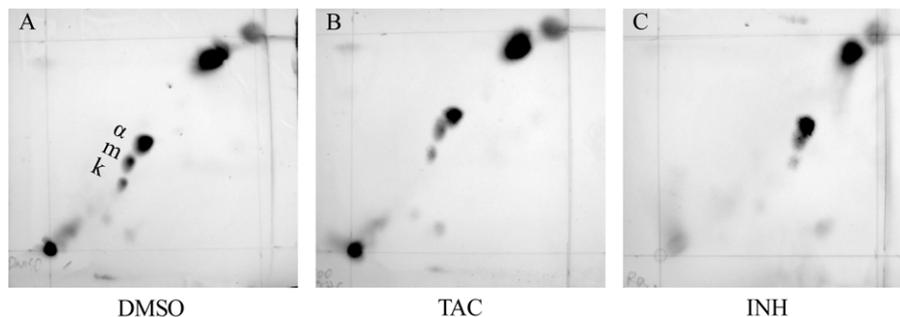


图 5 TAC、INH 处理对 Mtb 分枝菌酸影响的二向 TLC 分析

Figure 5 Two dimensional TLC analysis of methyl esters of mycolic acids (MAME) isolated from Mtb H37Ra treated with DMSO (A), TAC (B) or INH (C). Different forms of methyl esters were separated in n-hexane/acetone (19:1; 3 runs) in the first direction and in toluene/acetone (19:1; 1 run) in the second direction. α : α -mycolate; m: Methoxy-mycolate; k: Keto-mycolate.

因 *Rv1151c*^[10] 的过表达菌株和敲除菌株，并分析蛋白乙酰化修饰是否参与调控 Mtb 分枝菌酸的合成。分别培养结核分枝杆菌的去乙酰化酶基因 *Rv1151c* 过表达株、敲除株及野生型菌株至对数期，提取分枝菌酸并比较相同提取物

质量下的分枝菌酸含量。结果如图 6 所示，野生型菌株、过表达菌株和基因敲除型菌株之间的分枝菌酸含量无明显差异，说明蛋白的乙酰化修饰可能不参与本培养条件下 Mtb 的分枝菌酸生物合成的调控。

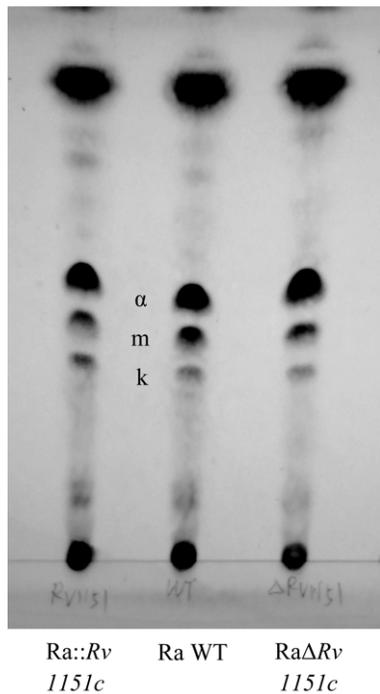


图 6 去乙酰化酶 Rv1151c 突变株对 Mtb 分枝菌酸影响的单向 TLC 分析

Figure 6 One dimensional TLC analysis of methyl esters of mycolic acids (MAME) isolated from Mtb H37Ra::Rv1151c, Mtb H37Ra wild type and Mtb H37RaΔRv1151c. Different forms of methyl esters were separated in n-hexane/ethyl acetate (95:5; 3 runs). α : α -mycolate; m: Methoxy-mycolate; k: Keto-mycolate; WT: Wild type; Δ : Delete.

3 讨论

分枝菌酸作为分枝杆菌属成员细胞壁独特成分, 主要通过 FAS-I 和 FAS-II 合成可达 C60 的长链脂肪酸后, 通过去饱和酶及甲基转移酶等多种酶在长 C 链的近端和远端引入双键、环丙基、甲氧基和酮类等功能基团形成不同类型分枝菌酸^[2-4]。MA 具有种属的特异性, 不同分枝杆菌之间携带的 MA 的亚型有很大差异, 例如 Mtb 有 α -MA、m-MA 和 k-MA, BCG Danish 只有 α -MA 和 k-MA^[11-12], 而 BCG Tokoyo 却有 α -MA、m-MA 和 k-MA^[7,12]。Msm 则有 α -MA、 α' -MA 和 ϵ -MA^[13], 而 Mab 只有 α -MA 和

α' -MA^[14]。且即使所含亚型相同, 不同亚型之间的比例也随分枝杆菌种类而不同, 例如 Mtb 的有毒株 Rv 和无毒株 Ra 的 MA 亚型比例不同^[11,15], Mm 有 α -MA、m-MA 和 k-MA, 但与 Mtb 比例也不同^[16], 提示 MA 的变化与分枝杆菌毒力和致病性密切相关, 且 MA 亚型组成成为诊断和鉴别不同分枝杆菌的标志性特征。MA 的酯化态通常分布于细菌的细胞壁上, 可占细胞干重的 40%–60%^[17], 这种强疏水的成分不仅维持着细胞膜的流动性同时导致细胞壁致密和低通透性, 利于分枝杆菌抵御宿主细胞内等不利环境下生存和耐受抗生素等。MA 可作为免疫调节分子帮助 Mtb 逃避宿主的免疫清除^[3], 因此分枝菌酸合成通路是抗结核药物及新药研发重要的作用靶点, 而 MA 亚型及含量的提取和分析技术在分枝杆菌相关基础和药物研究中极为重要。

目前文献报道中检测分枝菌酸的常用方法是将同位素 C14 标记的醋酸盐加入细菌培养基中, 用放射性薄层层析法检测细菌内分枝菌酸的合成情况^[5-7,11,13-16]。这种方法高效且灵敏度高, 通过放射显影即可见 MA 各亚型的变化情况, 但是该方法要求必须具备操作放射性元素的实验条件和资质, 且当前购买放射性元素手续繁琐, 大多研究机构难以具备该方法的资质要求。另一种方法是利用质谱分析技术定量检测, 常联合色谱技术(LC, GC)共同使用, 这种方法不需要使用放射性元素且精度高, 可依据色谱滞留时间区分立体异构体, 是当前较先进的检测分枝菌酸与通路代谢流的方法。例如王学谦等^[18]发明的专利, 这种方法可通过建立指纹谱库快速鉴定从临床菌株中提取出的分枝菌酸亚型, 进而鉴定分枝杆菌菌种。但色谱联合质谱的实验操作复杂, 仪器昂贵维护难, 数据分析需要大量专业知识和精力, 且不利于大批

量样品同时分析。而大多数研究如药物靶向 MA 合成通路的检测不需要高精度和庞大的分析结果和数据量。最重要的是,靶向质谱分析技术需要标准品,而 MA 亚型较多,目前全世界仅有 Merck 出售个别分枝菌酸亚型,且价格昂贵。而非靶向质谱也十分受限,目前常用的脂质数据库中只有 lipidmaps 含有个别分枝菌酸亚型,难以满足研究的需要。因此目前利用质谱技术对分枝菌酸分析的开发多集中在质谱方法学的开发中,例如多级线性离子阱质谱^[19]、高分辨率基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱^[20]、电喷雾离子化串联质谱^[21]等。

本研究利用非放射性薄层层析法,利用细菌胞壁中游离态和酯化态的分枝菌酸(如海藻糖单分枝菌酸酯和海藻糖双分枝菌酸酯)可在高温条件下溶于四丁基氢氧化铵,再用碘甲烷与之反应形成分枝菌酸甲酯,最后利用二氯甲烷和乙醚依次萃取得到脂质混合物。同时因不同亚型的官能团和碳链长度不同,在展开剂中的溶解度不同,因此通过在硅胶板上展开后即可被分离。它的优点是可利用文献报道中放射性薄层层析技术标识的各分枝菌酸的亚型特征,在没有标准品情况下可以清晰准确地辨识分枝菌酸的亚型条带。本研究在各菌株的分枝菌酸的亚型特征分析时,除了层析本身造成的位置误差使得边缘泳道的条带上移外,结果中的各亚型条带与文献中不同菌株的相同亚型的位置和比例一致,且不同菌株间的相同亚型位置也一一对应,例如图 1 中 Mm 和 Mtb 都有 α -MA、m-MA 和 k-MA,其条带位置可互相印证,且比例关系符合文献结果^[7,10-15]。说明本文使用的方法可有效用于分枝杆菌的 MA 提取及检测。相较于放射性薄层层析,它不需要使用放射性元素,安全性更高;相较于色谱质谱,它的处理步骤更简便,对样品要求低,仪器限制少,很

多需要用化学分析设备的步骤也可使用普通生物实验室仪器替代。但该方法也有缺点,相比放射性薄层层析和质谱方法,其可检测的差异灵敏度低,缺少标准品时无法绝对定量,并且灰度扫描技术在薄层层析条带上使用时有较大误差。如在靶向分枝菌酸合成通路的药物作用分析中,需要加入较高浓度药物时才能检测到分枝菌酸的变化,但可以用于药物是否靶向 MA 生物合成的初步筛选。

尽管相比放射性薄层层析和质谱技术,本研究中用于分枝菌酸分析的改良方法还存在一定的不足之处,但从研究不同场景应用的结果可见,该方法能清晰地比较出不同分枝杆菌的分枝菌酸成分,且发现处于稳定期分枝杆菌的分枝菌酸各亚型明显多于对数期菌,稳定期各亚型含量稳定存在的现象;同时在不使用放射性元素的情况下,可用于研究抗结核药物或潜在化合物是否靶向分枝菌酸合成的作用机制;在基础研究应用中,发现 Mtb 蛋白乙酰化修饰不参与分枝菌酸的合成调控。由于 MA 的强疏水成分导致细胞壁致密和低通透性与分枝杆菌的药物耐受密不可分,但鉴于 MA 分析方法的不便,还缺少 MA 与临床菌株的耐药相关的实验证据。根据文献^[22]中 Mtb 有毒株 H37Rv 与无毒株 H37Ra 的基因序列比较结果,参与 MA 合成的 FAS 通路中的脱水酶 Rv0635 (*hadA*)和 Rv0637 (*hadC*)出现了单个碱基的变化,推测该基因突变可能导致 Rv 与 Ra MA 亚型比例的不同^[11,15],同时也提示临床菌株基因组的突变可能会引起其 MA 比例的变化,因此未来该方法可用于临床菌株分枝菌酸的亚型和含量的差异变化。但鉴于临床结核分枝杆菌菌株的操作需要三级生物安全实验室及临床菌株的缺乏,本方法对临床分离菌株的分枝菌酸的鉴定还有待于未来进一步验证。总而言之,本文为分枝杆

菌如靶向 MA 合成通路的新型抗结核药物的作用机制等应用和基础多场景研究提供一种方便、可操作性强的 MA 及亚型的分析方法。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] ABRAHAMS KA, BESRA G. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target[J]. *Parasitology*, 2018, 145: 116-133.
- [3] KUANG WB, ZHANG HL, WANG X, YANG P. Overcoming *Mycobacterium tuberculosis* through small molecule inhibitors to break down cell wall synthesis[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(8): 3201-3214.
- [4] MARRAKCHI H, LANÉELLE M, DAFFÉ M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond[J]. *Chemistry Biology* 2014, 21(1): 67-85.
- [5] DOVER LG, ALAHARI A, GRATRAUD P, GOMES JM, BHOWRUTH V, REYNOLDS RC, BESRA GS, KREMER L. *EthA*, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(3): 1055-1063.
- [6] BANERJEE A, DUBNAU E, QUEMARD A, BALASUBRAMANIAN V, UM KS, WILSON T, COLLINS D, de LISLE G, JACOBS WR. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Science*, 1994, 263(5144): 227-230.
- [7] LIU YG, MATSUMOTO M, ISHIDA H, OHGURO K, YOSHITAKE M, GUPTA R, GEITER L, HAFKIN J. Delamanid: from discovery to its use for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)[J]. *Tuberculosis*, 2018, 111: 20-30.
- [8] STOVER CK, WARRENER P, VanDEVANTER D, SHERMAN D, ARAIN T, LANGHORNE M, ANDERSON SW, TOWELL J, YUAN Y, McMURRAY D, KREISWIRTH B, BARRY C, BAKER W. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis[J]. *Nature*, 2000, 405: 962-966.
- [9] BELLEY A, ALEXANDER D, Di PIETRANTONIO T, GIRARD M, JONES J, SCHURR E, LIU J, SHERMAN DR, BEHR MA. Impact of methoxymycolic acid production by *Mycobacterium bovis* BCG vaccines[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(5): 2803-2809.
- [10] BI J, WANG YH, YU HG, QIAN XY, WANG HH, LIU J, ZHANG XL. Modulation of central carbon metabolism by acetylation of isocitrate lyase in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44826.
- [11] FARJALLAH A, CHIARELLI LR, FORBAK M, DEGIACOMI G, DANIEL M, GONCALVES F, CARAYON C, SEGUIN C, FUMAGALLI M, ZÁHORSZKÁ M, VEGA E, ABID S, GRZEGORZEWICZ A, JACKSON M, PEIXOTO A, KORDULÁKOVÁ J, PASCA MR, LHERBET C, CHASSAING S. A coumarin-based analogue of thiacetazone as dual covalent inhibitor and potential fluorescent label of *HadA* in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 7(3): 552-565.
- [12] UENISHI Y, TAKII T, YANO I, SUNAGAWA M. Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 77(3): 320-322.
- [13] di CAPUA CB, BELARDINELLI JM, BUCHIERI MV, BORTOLOTTI A, FRANCESCHELLI JJ, MORBIDONI HR. Deletion of MSMEG_1350 in *Mycobacterium smegmatis* causes loss of epoxy-mycolic acids, fitness alteration at low temperature and resistance to a set of mycobacteriophages[J]. *Microbiology*, 2018, 164(12): 1567-1582.
- [14] KOZIKOWSKI AP, ONAJOLE OK, STEC J, DUPONT C, VILJOEN A, RICHARD M, CHAIRA T, LUN SC, BISHAI W, RAJ VS, ORDWAY D, KREMER L. Targeting mycolic acid transport by indole-2-carboxamides for the treatment of *Mycobacterium abscessus* infections[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(13): 5876-5888.
- [15] SINGH V, GRZEGORZEWICZ AE, FIENBERG S, MÜLLER R, KHONDE LP, SANZ O, ALFONSO S, URONES B, DREWES G, BANTSCHIEFF M, GHIDELLI-DISSE S, IOERGER TR, ANGALA B, LIU JY, LEE RE, SACCHETTINI JC, KRIEGER IV, JACKSON M, CHIBALE K, GHORPADE SR. 1,3-diarylpyrazolyl-acylsulfonamides target HadAB/BC

- complex in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. ACS Infectious Diseases, 2022, 8(11): 2315-2326.
- [16] JOSHI SA, BALL DA, SUN MG, CARLSSON F, WATKINS BY, AGGARWAL N, MCCRACKEN JM, HUYNH KK, BROWN EJ. EccA1, a component of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 protein virulence factor secretion pathway, regulates mycolic acid lipid synthesis[J]. Chemistry Biology, 2012, 19(3): 372-380.
- [17] GRZEGORZEWICZ AE, PHAM H, GUNDI VAKB, SCHERMAN MS, NORTH EJ, HESS T, JONES V, GRUPPO V, BORN SEM, KORDULÁKOVÁ J, CHAVADI SS, MORISSEAU C, LENAERTS AJ, LEE RE, McNEIL MR, JACKSON M. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane[J]. Nature Chemical Biology, 2012, 8(4): 334-341.
- [18] 王学谦, 赵凤毅, 王巨存. 分枝杆菌细胞壁中分枝菌酸的检测方法: CN102127585A[P]. 2011-07-20.
WANG XQ, ZHAO FY, WANG JC. Method for detection of mycolic acid in *Mycobacterium* cell wall: CN102127585A[P]. 2011-07-20 (in Chinese).
- [19] CHERYL F, HIDEJI F, WILLIAMS SPENCER J, ADRIAAN M, . Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2022, 33(1): 149-159.
- [20] TERAMOTO K, SUGA M, SATO T, WADA T, YAMAMOTO A, FUJIWARA N. Characterization of mycolic acids in total fatty acid methyl ester fractions from *Mycobacterium* species by high resolution MALDI-TOFMS[J]. Mass Spectrometry, 2015, 4(1): A0035.
- [21] SZEWCZYK R, KOWALSKI K, JANISZEWSKA-DROBINSKA B, DRUSZCZYŃSKA M. Rapid method for *Mycobacterium tuberculosis* identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 76(3): 298-305.
- [22] ZHENG HJ, LU LD, WANG BF, PU SY, ZHANG XL, ZHU GF, SHI WL, ZHANG L, WANG HH, WANG SY, ZHAO GP, ZHANG Y. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2375.

(本文责编 郝丽芳)